

乳に含まれるアフラトキシン M1 の試験法について

乳中のアフラトキシン M1（以下「AFM1」という。）の検査は、以下の I に示す試験法により実施することとし、また、スクリーニングのための分析法を II に示す。

I AFM1 試験法

1. 装置

蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-FL）

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC-MS）又は液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

2. 試薬、試液等

次に示すもの以外は、食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）第 2 添加物の部 C 試薬・試液等の項に掲げるものを用いる。

AFM1 標準品^{1), 2)}：AFM1 を 98%以上含むもの。

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用に製造されたもの。

水：超純水又は高速液体クロマトグラフ用に製造されたもの。

生理的リン酸緩衝液（PBS）³⁾：塩化カリウム 0.20 g、リン酸二水素カリウム 0.20 g、リン酸二水素ナトリウム（無水）1.16 g（又はリン酸二水素ナトリウム 12 水和物 2.92 g）、塩化ナトリウム 8.0 g を 900 mL の水に溶解し、0.1 mol/L 塩酸又は水酸化ナトリウム溶液で pH 7.4 に調整し、1 L に定容する。

イムノアフィニティカラム⁴⁾：アフラトキシン特異抗体を結合させた樹脂を充填したもの。

ガラス繊維ろ紙：粒子保持能 1～1.5 μm のホウケイ酸ガラス繊維のもの。

3. 試験溶液の調製

(1) 試料の調製

37℃に加熱した乳をガラス繊維ろ紙を用いてろ過し、試料とする。生乳などの均質化処理されていない乳については、遠心処理（2000×g、15 分）を行った後、上層の脂肪層を除去する。残った下層の液体部分をガラス繊維ろ紙でろ過し、試料とする。

(2) 精製

試料 20.0 g をイムノアフィニティカラムに注入した後、毎秒約 1～2 滴の流速で流出し、流出液は捨てる⁵⁾。次いで、水約 15 mL を注入し、流出液を捨てた後⁶⁾、アセトニトリル 3 mL を注入し、溶出液を採る⁷⁾。

(3) 試験溶液の調製

溶出液を 45℃以下で窒素気流を用いて濃縮し、溶媒を除去する⁸⁾。この残留物にアセトニトリル及び水（1：4）の混液 1.0 mL を加えよく混合したものを試験溶液とする^{9, 10)}。

4. 検量線の作成

AFM1 標準品をアセトニトリルで希釈し、1.0～20.0 µg/L の濃度範囲の溶液を数点調製する。それぞれ 1.0 mL を採り、45℃以下で窒素気流を用いて溶媒を除去する。残留物にアセトニトリル及び水（1：4）の混液を加えてよく混合する¹⁰⁾。それぞれ 100 µL¹¹⁾を HPLC に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

5. 定量

試験溶液 100 µL¹²⁾を HPLC に注入し、4. で得られた検量線により小数第 2 位まで AFM1 の分析値を求める。分析値を 20 で除し、小数第 3 位を四捨五入して乳中の AFM1 の定量値とする。

6. 確認試験

3. (3) で得られた試験溶液を LC-MS 又は LC-MS/MS に注入して確認する¹³⁾。

7. 測定条件例

検出器：FL（励起波長 365 nm、蛍光波長 435 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 4.6 mm、長さ 150～250 mm、粒径 3～5 µm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び水（1：3）混液

流速：1.0 mL/分

8. 定量限界

0.05 µg/kg

<注解>

- 1) AFM1 は強い発がん性を有する物質であるため、取扱いに注意すること。なお、試験に用いた器具、前処理用カラム、検体等は、廃棄又は洗浄する前に、0.5～1.0 % (v/v) 濃度の次亜塩素酸ナトリウムに 2 時間以上浸漬すること。
- 2) 正確に濃度調製された市販標準溶液が使用可能である。
- 3) 市販の錠剤が使用可能である。

- 4) 市販のカラムが使用可能である。なお、使用前にカラム中のゲルに亀裂や気泡が生じていないことを確認し、亀裂や気泡が生じている場合には、カラム上部から注射器等で圧力を加えて除去すること。
- 5) イムノアフィニティカラムの下部にストップコックを取り付け、これをバキューummマニホールド等に連結し、カラム内の溶液を全部流出させた後、カラム内に PBS を満たし全量を流出させ、カラムのコンディショニングを行う。その後、カラム内に PBS を満たし、カラム容量の約半分の量の PBS を流出させた後、ストップコックを閉め、リザーバー又は注射筒をコネクターを用いてカラムと連結する。
- 6) 洗浄する時にはストップコックで流速を調節する必要はない。また洗浄する際には、リザーバーをカラムから取り外した後、カラム内をピペット等を用いて水で満たし、その全量を排出させる操作を 5 回ほど繰り返すことが有効である。
- 7) 注射器にリザーバーコネクターを取り付けたものを用意し、これをカラム上部に連結し、空気を押し出すことによりカラム内に残った水分を除去する。その後アセトニトリル 1 mL をカラムに注入し、自然落下で溶出させた後 5 分間放置する。さらにアセトニトリル 1 mL をカラムに注入し溶出する。この操作をもう一度繰り返した後、注射器で空気を押し出すことによりカラム中ゲル内のアセトニトリルを溶出する。
- 8) 溶出液から溶媒を除去する際に AFM1 が容器に吸着することがある。この場合、シラン処理した容器（使用前に 20～30%アセトニトリル水等で洗浄し、乾燥させたもの）を用いることが望ましい。
- 9) 必要に応じて、遠心処理等で不溶物を除去後、HPLC 用試験溶液とする。
- 10) HPLC 注入用の容器として、ガラス製品を用いるとシラン処理を行った容器においても AFM1 が吸着することがあるため、ポリプロピレン製の樹脂製の容器を用いるとよい。
- 11) 検出器の性能により、注入量を変更してもよい。
- 12) 標準溶液の注入量と同じにする。
- 13) LC-MS 又は LC-MS/MS の測定条件の例を以下に示す。

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 3～5 μm ）

カラム温度：40℃

移動相：A 溶媒 10 mmol/L 酢酸アンモニウム、B 溶媒 アセトニトリル

分離条件：B 液：30%→8 分→80%→1 分→80%

流速：0.2 mL/分

注入量：10 μL

イオン化モード：ESI（+）

検出イオン（ m/z ）：

<LC-MS>

329 $[M+H]^+$

<LC-MS/MS>

プリカーサーイオン 329 $[M+H]^+$ 、プロダクトイオン 273、229

保持時間の目安：5.1 分

II AFM1 スクリーニング法

乳中の AFM1 のスクリーニングにはイムノクロマト法を原理とした分析キットを用いる。スクリーニング法により、陰性と判断された場合を除き、上述の「I AFM1 試験法」による陽性か否かの判断を行う。

1. 使用可能なキットの基準

(1) 真度

以下に示す AFM1 確認用溶液を用いて少なくとも 6 回の試験を行い、定量キットにおいては回収率が常に 70%を上回ることを、定性キットにおいては常に陽性と判定されることを確認する。

AFM1 濃度が 0.05 µg/kg 以下であることを I に定める試験法により確認された乳（以下「ブランク乳」という。）を用いて少なくとも 6 回の試験を行い、定量キットにおいては常に 100 ppt を下回ることを、定性キットにおいては常に陰性と判定されることを確認する。

<AFM1 確認用溶液の調製法>

正確に濃度調製された市販標準溶液をアセトニトリルによって希釈し、標準品原液 0.5 mg/L を調製する。標準品原液 1.0 mL を取り、ブランク乳で 10 mL とし、さらにこの溶液を 1.0 mL 採り、ブランク乳で 10 mL とする。さらにこの溶液を 1.0 mL 採り、ブランク乳で 10 mL としたものを確認用溶液（AFM1 濃度 0.5 µg/L）とする。

(2) 検出限界

100 ppt 以下であること。

(3) 結果の評価方法

キット付属のリーダーにより、判定が可能であること。定量キットでは 300 ppt 未満の場合を、定性キットでは陰性と表示された場合、陰性と判断する。

2. 分析にあたっての留意事項

- ・使用期限及び保存温度を確認し、遵守すること。
- ・キット及び試薬類は使用前に室温に戻しておくこと。
- ・各キットを販売する販売者又は輸入代理店から詳細な取り扱い説明書を入手し、技術的な習得を行うこと。